

JP 05-049473

[0010]

Moreover, in establishing rat brain microglia cellular in, this invention offers the establishment approach of the rat brain microglia cellular in characterized by incorporating the large T gene of SV40 as an unlimited proliferation-ized gene in the gene of rat brain microglia by recombinant DNA technology.

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 5 - 4 9 4 7 3

(43) 公開日 平成 5 年 (1993) 3 月 2 日

(51) Int. Cl. <sup>s</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 5/10				
A61K 35/12		9165-4C		
35/30	AAM	9165-4C		
C12N 15/09				
// C12P 21/02		H 8214-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平 3 - 2 0 4 3 4 3

(22) 出願日 平成 3 年 (1991) 8 月 1 4 日

(71) 出願人 0 0 0 1 8 1 1 4 7

持田製薬株式会社

東京都新宿区四谷 1 丁目 7 番地

(72) 発明者 高 坂 新 一

東京都杉並区成田西 3 - 1 2 - 1 9

(72) 発明者 半 田 宏

東京都世田谷区桜上水 1 - 1 7 - 1 6

(72) 発明者 植 村 昭 夫

静岡県沼津市泉町 3 - 3 0 シテイーバル  
泉町 1 0 3

(74) 代理人 弁理士 渡辺 望稔 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 ラット脳ミクログリアセルライン

(57) 【要約】

【構成】 本発明は、a) 直径約  $60 \pm 50 \mu m$  のほぼ球形、b) 無限な継代培養可能、c) 神経細胞の生存、成長、神経突起伸展を促進する新規な因子を産生し、培養上清中に放出する、以上の性質を有するラット脳ミクログリアセルラインであり、ラット脳ミクログリアの遺伝子内に無限増殖化遺伝子を組み込み該ラット脳ミクログリアセルラインを樹立する方法である。さらに、神経細胞の生存、成長、神経突起伸展を促進する新規な神経栄養因子を含むラット脳ミクログリアセルラインの培養上清および細胞ホモジネートである。

【効果】 ラット脳ミクログリアセルラインを大量培養することで、神経細胞の生存、成長、神経突起伸展を促進する新規な神経栄養因子を大量に生産でき、神経細胞の機能障害を伴う脳疾患の治療に有用な物質を得ることができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の性質を有するラット脳ミクログリアセルライン。

- a) 細胞の形態：直径約  $60 \pm 50 \mu m$  のほぼ球形
- b) 継代培養：無限な継代培養可能
- c) 機能的特徴：神経細胞の生存、成長、神経突起伸展を促進する新規な因子を産生し、培養上清中に放出する。

【請求項 2】 ラット脳ミクログリアの遺伝子内に、無限増殖化遺伝子を組み込むことによって樹立した請求項 1 に記載のラット脳ミクログリアセルライン。

【請求項 3】 前記無限増殖化遺伝子が SV 40 温度感受性変異株のラージ T 遺伝子である請求項 2 に記載のラット脳ミクログリアセルライン。

【請求項 4】 微工研菌寄第 1 2 4 2 6 号である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のラット脳ミクログリアセルライン RBM 1 0 3。

【請求項 5】 微工研菌寄第 1 2 4 2 7 号である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のラット脳ミクログリアセルライン RBM 1 1 2。

【請求項 6】 微工研菌寄第 1 2 4 2 8 号である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のラット脳ミクログリアセルライン RBM 1 2 9。

【請求項 7】 請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のラット脳ミクログリアセルラインを樹立するにあたり、組換え DNA 技術によってラット脳ミクログリアの遺伝子内に、無限増殖化遺伝子として SV 40 のラージ T 遺伝子を組み込むことを特徴とするラット脳ミクログリアセルラインの樹立方法。

【請求項 8】 初代培養ラット脳ミクログリアの培養上清と同様な神経細胞の生存、成長、神経突起伸展を促進する作用を有する新規な因子を含有する請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のラット脳ミクログリアセルラインの培養上清および／または当該セルラインの細胞ホモジネート。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、周産期ラット脳より得られるミクログリアの遺伝子に外来の無限増殖化遺伝子を組み込むことによって得られるラット脳ミクログリアセルライン、そのセルラインの樹立方法、および神経細胞の生存、成長、神経突起伸展を促進する作用（以下神経栄養効果という）を有する前記セルラインの培養上清および／または前記セルラインの細胞ホモジネートに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 中高年層に多く見られる疾患である脳血管障害やアルツハイマー型老年痴呆の治療においては、ホパテン酸カルシウム、イデベノンなどの脳代謝賦活薬や、イフェンプロジル、シンナリジン、ニカルジピン

等の脳循環改善薬が多用されているが、これらの薬物の作用メカニズムについては不明な点が多く、臨床的な治療効果も不十分であり、対症療法的に用いられているのが実状である。これに対して、前記脳疾患の直接原因である神経細胞の虚血による障害や老化による機能低下を回復させることによる本質的治療を目的として、神経成長因子（NGF）などの神経栄養効果を有する因子（神経栄養因子、以下 NTF と略称する）を生体より探索・発見し、医薬品として応用する試みが盛んに行なわれている。

【0003】 一方、中枢神経系の主要な構成細胞の 1 つであるミクログリアは、1932 年、リオール・ホルテガ（Rio-Hortega）が初めてその存在を報告して以来、その生理的意義については不明な点が多かったが、近年、脳におけるグリオシス、免疫反応、損傷の修復等の過程に何らかの関与をしているとの考えが提出されて、その機能を調節することが前出の脳疾患の治療につながるものと考えから注目を集めている。本発明者らは、ミクログリアが産生する NTF を見いだすため、ミクログリアの単離、培養方法について研究を重ね、ラット脳からミクログリアを純粋な形で得るための優れた方法を開発し、さらに、その方法により得られたミクログリアの培養上清に、神経栄養効果があることを見いだした（バイオメディカル リサーチ（Biomed. Res.）10（S3），411-423，1989）。一方、リジイ（Righi）らはマウス脳初代培養細胞に発ガン遺伝子 v-myc または v-mil を持ったレトロウイルス MH2 を感染させることによってミクログリアの不死性クローンを得、それが IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  を産生していることを報告した（ヨーロッパジャーナル オブイムノロジー（Eur. J. Immunol.）19，1413-1418，1989）。また、ブラシ（Blasi）らも同様に発癌遺伝子 v-raf/v-myc を持ったレトロウイルス J2 をもちいてマウス脳ミクログリアの不死化に成功したと報告している（ジャーナル オブ ニューロイムノロジー（J. Neuroimmunol.）27，229-237，1990）。しかしながら、上記 2 種のマウス脳ミクログリアセルラインでは神経栄養効果の報告はされていない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 脳血管障害やアルツハイマー型老年痴呆など、神経細胞の機能低下による脳疾患の原因療法薬は未だ現われていないのが実状であり、高齢化社会の到来により社会問題化しつつあるこれら疾患の、本質的治療薬の開発が切望されている。本発明者らの最終目的は、神経系の低下した機能を改善する作用を持つ新規な NTF を探索、発見して上記のような治療薬を開発する事であるが、その第一段階として、そのような新規な NTF を産生する培養細胞株を開発し、その

物質を効率的に生産する方法を提供することが本発明の課題である。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】本発明は、前記課題を解決するために周産期ラット脳より得られるミクログリアの遺伝子内に外来の無限増殖化遺伝子を組み込むことによって得られるラット脳ミクログリアセルライン、そのセルラインの樹立方法、および神経栄養効果を有する前記セルラインの培養上清および／または前記セルラインの細胞ホモジネートを提供するものである。

【 0 0 0 6 】すなわち本発明は、以下の性質を有するラット脳ミクログリアセルラインを提供するものである。

- a) 細胞の形態：直径約  $60 \pm 50 \mu\text{m}$  のほぼ球形
- b) 継代培養：無限な継代培養可能
- c) 機能的特徴：神経細胞の生存、成長、神経突起伸展を促進する新規な因子を産生し、培養上清中に放出する。

【 0 0 0 7 】さらに、本発明のラット脳ミクログリアセルラインはラット脳ミクログリアの遺伝子内に、無限増殖化遺伝子を組み込むことによって樹立した場合に好適である。

【 0 0 0 8 】特に、本発明のラット脳ミクログリアセルラインは前記無限増殖化遺伝子が SV 40 温度感受性変異株のラージ T 遺伝子である場合に好適である。

【 0 0 0 9 】本発明のラット脳ミクログリアセルラインは微工研菌寄第 1 2 4 2 6 号である RBM 1 0 3、微工研菌寄第 1 2 4 2 7 号である RBM 1 1 2、または、微工研菌寄第 1 2 4 2 8 号である RBM 1 2 9 である場合に好適である。

【 0 0 1 0 】また、本発明はラット脳ミクログリアセルラインを樹立するにあたり、組換え DNA 技術によってラット脳ミクログリアの遺伝子内に、無限増殖化遺伝子として SV 40 のラージ T 遺伝子を組み込むことを特徴とするラット脳ミクログリアセルラインの樹立方法を提供する。

【 0 0 1 1 】さらに本発明は、初代培養ラット脳ミクログリアの培養上清と同様な神経細胞の生存、成長、神経突起伸展を促進する作用を有する新規な因子を含有する前記セルラインの培養上清および／または前記セルラインの細胞ホモジネートを提供する。

【 0 0 1 2 】以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 3 】本発明のラット脳ミクログリアセルラインは以下の様にして得られる。胎生期あるいは新生児のラット脳を摘出し、トリプシン、パパイン、コラゲナーゼなどの酵素で処理することにより細胞を分散させ、1～20%牛胎児血清および成長因子などを含有するダルベッコ変型イーグル培地 (DMEM) などの細胞培養用培地にて適当な培養容器に播種して初代培養を行う。3日以上経過した後、培養容器を振とうすることにより浮遊してくるミクログリアを得る。これを新たな培養容器

に接着させ、さらに培養を継続する。

【 0 0 1 4 】この細胞に無限増殖化遺伝子を pUC 19 などの適当な発現ベクターと結合させ、遺伝子内に導入することにより恒久的に継代可能なセルラインを得ることができる。該無限増殖化遺伝子は例えば SV 40 のラージ T 遺伝子、特に、SV 40 温度感受性変異株由来のラージ T 遺伝子などを使うことができるが、他のものでも可能である。また、遺伝子が導入された細胞を容易に選別するためにトランスポゾン 5 などの薬剤耐性遺伝子を共導入することもできる。細胞に遺伝子を導入する方法としてはリン酸カルシウム共沈澱法、リポソーム封入法、電気ショック法、あるいはウイルス感染による方法などがあるが、他の適当な方法でも可能である。遺伝子導入操作後は、通常、単一クローン株を得るための操作が必要である。すなわち、培養を継続、観察し、増殖性コロニーが形成された時、それを新たな培養容器に継代する。充分な細胞数が得られた状態で、限界希釈法によりウェルあたり細胞が 1 個となるように継代する。その後分裂、増殖してきた各クローンを取り出し、表面積が漸増する培養容器を用いて細胞を継代して単一クローン株として下記の性質を有する本発明のラット脳ミクログリアセルラインを得ることができる。

- a) 細胞の形態：直径約  $60 \pm 50 \mu\text{m}$  のほぼ球形
- b) 継代培養：無限な継代培養可能
- c) 機能的特徴：神経細胞の生存・成長・神経突起伸展を促進する新規な因子を産生し、培養上清中に放出する。

さらに、このミクログリアセルラインは下記の性質を有する。

- d) 細胞増殖性：通常の細胞培養用培地にて良好に増殖する。世代倍加時間は  $16 \pm 4$  時間である。
- e) 保存条件： $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存可能

【 0 0 1 5 】このようにして得られたラット脳ミクログリアセルライン中の RBM 1 0 3、RBM 1 1 2 および RBM 1 2 9 と命名したものを、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成 3 年 8 月 1 3 日にそれぞれ微工研菌寄第 1 2 4 2 6 号 (FERM P-12426)、微工研菌寄第 1 2 4 2 7 号 (FERM P-12427)、および微工研菌寄第 1 2 4 2 8 号 (FERM P-12428) として寄託している。

【 0 0 1 6 】このようにして得られたセルラインは、導入した遺伝子産物に対する抗体を用い、免疫染色法あるいはウエスタンブロット法などにより、当該遺伝子産物が発現されていることが確められる。また、ミクログリアのマーカーである ED-1 などに対する抗体を用いた免疫染色法などにより、当該セルラインがミクログリアであることが確認できる。実際にこれらの検討を行った結果を以下に示す。

【 0 0 1 7 】図 1 は、実施例 1 で示されている抗ラージ T 抗原抗体を用いて、当該セルラインホモジネートをウ

10

20

30

40

50

エスタンプロット法により染色した結果である。このように、ミクログリアに外来性に導入した遺伝子の発現産物であるラージT抗原が当該セルラインにおいて発現しているのが確認できる。

【0018】表1には、中枢神経系細胞のマーカー蛋白の抗体による免疫染色性、レクチン結合性、酵素活性、

ラテックスビーズ食食能などの種々の細胞特性について、本発明のラット脳ミクログリアセルラインをラット脳より得た初代培養ミクログリアおよび初代培養アストログリアと詳細に比較した結果を示す。

【0019】

表 1

項 目	本発明 セルライン <sup>1)</sup>	初代培養 ミクログリア <sup>1)</sup>	初代培養 アストログリア <sup>1)</sup>
免疫染色性 <sup>1)</sup>			
ED-1	有り	有り	無し
ニューロフィラメント	無し	無し	無し
GFAP	無し	無し	有り
MBP	無し	無し	無し
ガラクトセブロシド	無し	無し	無し
B4イソレクチン結合性 <sup>1)</sup>	有り	有り	無し
非特異的エステラーゼ活性 <sup>1)</sup>	高い	高い	低い
食食能 <sup>1)</sup>	高い	高い	低い
無限増殖能	有り	無し	無し

GFAP グリア線維性蛋白質

MBP ミエリン塩基性蛋白質

1) 実施例1により調製したミクログリアセルライン、RBM103、RBM112、およびRBM129

2) ナカジマ (Nakajima) らの方法による (バイオメディカル リサーチ (Biomed. Res.) 10 (S3), 411-423, 1989)

3) マッカーシー (McCarthy) らの方法による (ジャーナル オブセル バイオロジー (J. Cell Biol.) 85, 890-902, 1980)

【0020】表1に示されるように、初代培養で得たミクログリアと本発明のラット脳ミクログリアセルラインの細胞特性は、本発明セルラインが無限増殖能を有することを除いてよく一致していた。従って本発明のラット脳ミクログリアセルラインは初代培養のミクログリアの細胞特性を保持したまま無限増殖能が付与されたセルラインであると考えられる。

【0021】本発明のラット脳ミクログリアセルラインは、10%牛胎児血清を添加したDMEMなどで恒久的に継代培養が可能である。細胞が培養容器内で密集状態になったときは、例えばトリプシンなどを用いて細胞を培養容器から一旦離脱させ、新たな培養容器で繰り返し継代、培養することができる。また、本発明のラット脳ミクログリアセルラインは、血清あるいは血清を含む培地などに5~20%となるようにジメチルスルホキシドのような保存剤を添加した溶媒に懸濁し凍結させ、液体窒素中などで保存できる。さらに凍結保存状態から例えば温湯につけて融解し、再び継代培養することもでき

る。

【0022】上記セルラインの培養に用いる血清としては、牛胎児血清のほか、牛準胎児血清、仔牛血清、ラット血清、馬血清などを用い、培地としては、最小必須培地 (MEM)、DMEM、F12、RPMI 1640などを用いることができる。また、必要に応じて、インシュリン、トランスフェリン、ブトレッシン、セレンなどの成長因子や、ゲンタマイシン、カナマイシンなどの抗菌剤を培地に添加すると良い。

【0023】本発明の細胞培養上清および細胞ホモジネートは、本発明のラット脳ミクログリアセルラインを培養することによって得られる。すなわち、本発明のラット脳ミクログリアセルラインを一定期間培養した後、無血清の培地により数回洗浄し、同じ無血清の培地で12~24時間培養し、さらに細胞を遠心分離で除くことにより、培養用血清に含まれる成長因子などの挟雑物を除外した形で細胞培養上清を得る。また、上記細胞を適当な緩衝液で数回洗浄後、ワーリングブレンダー、超音波破碎機等で破碎することにより細胞ホモジネートを得る。

【0024】このように得られた培養上清や、細胞ホモジネートより、塩析、陰イオンあるいは陽イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーなどの操作を組み合わせることにより、神経栄養効果の本体であるNTFを精製、取得することもでき

る。

【0025】本発明の細胞培養上清または細胞ホモジネートから得られたNTFの遺伝子をクローニングし、それをプローブとしてヒトのcDNAライブラリーをスクリーニングし、ヒトでの当該因子に相当する物質を得ることもできる。また、本発明の培養上清または細胞ホモジネートのNTFの抗体を作製し、この抗体に反応するヒト由来のNTFを、ヒトでの同一因子に相当する物質として得ることもできる。

【0026】本発明の培養上清は、後に実施例3で説明するように、顕著な神経栄養効果を示す。すなわち、本発明のラット脳ミクログリアセルラインのRBM129、RBM103またはRBM112の培養上清を、ラット脳大脳皮質神経細胞の培養液に10ないし50% (v/v) となるように加え、数日間培養することにより、対照試料に対して1.5~10倍の生細胞数を示す。上記培養系に、既知の種々の成長因子を十分な濃度加え、数日間培養しても、本発明の細胞培養上清の神経栄養効果に匹敵する効果を示さない。また神経突起の伸展も本発明の培養上清の添加によってのみ促進される。従って、本培養上清中に含まれているNTFはこれら既存の成長因子とは異なる、新規な物質である。

【0027】本発明の細胞培養上清は、神経細胞の成長、生存を促進することから、本発明の細胞培養上清中のNTFを有効成分として含有する医薬組成物は、脳血管障害やアルツハイマー型老年痴呆など神経細胞の機能障害による脳疾患の治療薬として有効に利用できる。

【0028】

【実施例】以下、本発明の実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに限るものではない。

【0029】(実施例1) 不死化ミクログリアセルラインの樹立

新生児ラット脳より大脳皮質を摘出し、0.25%トリプシン溶液とともに10分間インキュベートし、ピペットで攪拌することにより細胞を分散させ、10%牛胎児血清含有DMEMにて2回洗浄した後、同じ培地に再懸濁して37℃、10%CO<sub>2</sub>で初代培養を行った。5日後、培養容器を静かに振とうする事により浮遊してくる細胞を新たな培養容器に播いて数時間培養することにより接着性細胞を得た。

【0030】以下、図2により説明する。SV40温度感受性変異株であるts100 (ジャーナル オブ バイロロジー (J. Virol.) 15, 1297-1301, 1975) より抽出精製したDNAを制限酵素EcoRIとPvuIIにより消化した。SV40初期遺伝子領域を含むDNA断片を、発現ベクターpBR322のEcoRI-PvuIIサイトに挿入し、pBR322tsTを作製した。pBR322tsTをグルツマン (Glutzman) らの方法 (プロシーディングス

オブ ザ ユナイテッド ステイト オブ アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 77, 3898-3902, 1980) に従い、複製開始部位欠損変異体pBR322ODtsTを作製した。これをEcoRI、PvuIIで消化後、XbaIリンカーを結合し閉環させ、SVODtsTを作製した。その後、XbaIで消化し、SV40初期遺伝子領域を含む断片を発現ベクターpUC19に挿入し、pUC-SVODtsTを作製した。次いで、pUC-SVODtsTを常法により大腸菌を宿主として増幅し、プラスミドDNAを調製した。なお、使用した制限酵素は宝酒造社製のものをを用いた。

【0031】このpUC-SVODtsT 10μgとカナニ (Cannani) ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5166-5170, 1982) により示されている別に調製したpSV2Neo 5μgを混合し、リン酸カルシウム法に基づく遺伝子導入試薬 (セル フェクト トランスフェクション キット (Cell Phect Transfection Kit) : ファルマシア社製) を用い、上記の通り得たミクログリア細胞に添加し、37℃、10%CO<sub>2</sub>で培養した。6時間後、培地を交換しさらに48時間培養した。次にG418 400μg/mlを添加し培養を継続した。2週間後、G418抵抗性のコロニーが観察されたので単離し、G418 200μg/mlを含む培地で維持培養した。増殖してきた細胞をトリプシン処理により剥離して新しい培地に懸濁し、96ウェルプレートにウェルあたり1個の細胞が入るように播種した。光学顕微鏡下に1個の細胞のみが入っているウェルを確認し、培養を継続した。増殖してきたモノクローナルな細胞は多数あったが、そのうち3種について、ガラスガバスリップ上にホルマリン固定し、ミクログリアのマーカーであるED-1に対する抗体を用いて免疫染色を施したところ、陽性であった。また、細胞ホモジネートを調製し、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行い、ニトロセルロース膜上に転写後、抗ラージT抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。結果を図1に示す。図1中のAはポジティブコントロールであるcos-7、Bは初代培養ミクログリア、Cはラット脳ミクログリアセルラインであるRBM129である。RBM129細胞ホモジネートでは、SDS-PAGE上、ポジティブコントロールであるcos-7同様、分子量約94キログルトンの位置に単一のバンドが認められ、導入した遺伝子の産物であるラージT蛋白質の発現が確かめられた。また、これらの細胞を30回継代培養してもその増殖能は衰えなかった。これらの細胞をそれぞれ、ラット脳ミクログリアセルラインRBM103、RBM112およびRBM129と命名した。

【0032】これらのラット脳ミクログリアセルライン

RBM103、RBM112およびRBM129の細胞生物学的および機能的性質を挙げると、以下の通りとなる。

【0033】RBM103（微工研菌寄第12426号）

- a) 細胞の形態：直径約 $55 \pm 40 \mu\text{m}$ のほぼ球形  
d) 細胞増殖性：通常の細胞培養用培地にて良好に増殖する。世代倍加時間は $15 \pm 3$ 時間である。  
e) 染色体数：表2の通り

【0034】RBM112（微工研菌寄第12427号） 10

- a) 細胞の形態：直径約 $65 \pm 50 \mu\text{m}$ のほぼ球形  
d) 細胞増殖性：通常の細胞培養用培地にて良好に増殖する。世代倍加時間は $16 \pm 4$ 時間である。  
e) 染色体数：表2の通り

【0035】RBM129（微工研菌寄第12428号）

- a) 細胞の形態：直径約 $60 \pm 50 \mu\text{m}$ のほぼ球形  
d) 細胞増殖性：通常の細胞培養用培地にて良好に増殖する。世代倍加時間は $17 \pm 3$ 時間である。  
e) 染色体数：表2の通り  
【0036】さらに、上記3種のラット脳ミクログリアセルラインは以下に示す通りの共通な性質を有する。  
b) 継代培養：無限な継代培養可能  
c) 機能的特徴：神経細胞の生存、成長、神経突起伸展を促進する新規な因子を産生し、培養上清中に放出する。  
e) 保有条件： $-80^\circ\text{C}$ で凍結保存可能  
【0037】

表 2

染色体数	RBM103 <sup>1)</sup>		RBM112 <sup>2)</sup>		RBM129 <sup>3)</sup>	
	細胞数	割合(%)	細胞数	割合(%)	細胞数	割合(%)
38	0	0	1	1.7	0	0
42	1	1.5	0	0	0	0
58	0	0	1	1.7	0	0
61	1	1.5	2	3.4	1	1.3
62	3	4.5	4	6.9	0	0
63	2	3.0	2	3.4	3	3.9
64	4	6.1	1	1.7	2	2.6
65	6	9.1	6	10.3	5	6.5
66	11	16.7	21	36.2	10	13.0
67	19	28.8	2	3.4	13	16.9
68	7	10.6	8	13.8	27	35.1
69	5	7.6	5	8.6	10	13.0
70	1	1.5	1	1.7	5	6.5
72	2	3.0	2	3.4	1	1.3
78	0	0	1	1.7	0	0
103	1	1.5	0	0	0	0
120	0	0	1	1.7	0	0
122	1	1.5	0	0	0	0
134	1	1.5	0	0	0	0
216	1	1.5	0	0	0	0

1) 66ケの細胞を調べたデータ  
3) 77ケの細胞を調べたデータ

2) 58ケの細胞を調べたデータ

【0038】（実施例2）培養上清の取得

実施例1にて得られたラット脳ミクログリアセルラインRBM103、RBM112およびRBM129を、各々10%牛胎児血清含有DMEM培地8mlを用いて75cm<sup>2</sup>の培養用フラスコに播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。5日後、この細胞を無血清のDMEM培

地にて数回洗浄した後、無血清の同じ培地でさらに24時間培養し、細胞数約 $10^4$ 個とした。次いで細胞成分を遠心分離で除くことにより、本発明の細胞培養上清約8mlを得た。

【0039】（実施例3）培養上清の神経栄養効果

吉田らの方法（ニューロサイエンス レターズ（Neu

roscience Letters), 66, 181, 1986) に従い、胎生16~18日齢のラット脳の脳皮質より神経細胞を単離して、1%牛胎児血清および成長因子などを含むMEM培地に懸濁し、予めポリリジンをコーティングした培養プレートに $10^5$ 個/ml/ウェルにて、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。24時間後に実施例2で取得した本発明のラット脳ミクログリアセルラインRBM103、RBM112およびRBM129の培養上清を神経細胞の培養液に10あるいは50% (v/v) の割合で加え、5日間培養した後に位相差顕微鏡を用いて神経突起の状態を観察し、生細胞数をMTT法(モスマン(Mosmann T), ジャーナルオブイムノロジカルメソッズ(J. Immunol. Methods), 65, 55-63, 1983)にて測定した。結果を表3に示す。実験の結果、本発明のラット脳ミクログリアセルライン、RBM129、RBM103、またはRBM112の培養上清は、対照の平均を100として、それぞれ表3に示す生細胞数を示した。同時に検討した既知の種々の成長因子は、各々の作用発現に十分な濃度を添加したにもかかわらず、本発明の培養上清の効果に匹敵する効果を示す因子はなかった。また神経突起の伸展も本発明の培養上清の添加によってのみ促進されていた。従って、本培養上清中に含まれているNTFはこれら既存の成長因子とは異なる、新規な物質であることが示された。

【0040】

表 3

サンプル (用量)		生細胞数 (対照の平均を100とした)	
対照		100 ± 2	
RBM129の培養上清 (10% (v/v))		193 ± 2	
(50% (v/v))		339 ± 10	
RBM103の培養上清 (50% (v/v))		298 ± 9	
RBM112の培養上清 (50% (v/v))		315 ± 11	
NGF (100 ng/ml)		103 ± 4	
EGF (100 ng/ml)		103 ± 1	
PDGF (100 ng/ml)		102 ± 1	
TGF $\alpha$ (100 ng/ml)		103 ± 2	
TGF $\beta$ (100 ng/ml)		95 ± 14	
IGF-I (100 ng/ml)		99 ± 1	
bFGF (100 ng/ml)		109 ± 3	
TNF (100 ng/ml)		100 ± 6	
IFN $\alpha$ (10 U/ml)		120 ± 5	
IL-1 (10 U/ml)		108 ± 5	
IL-6 (10 U/ml)		113 ± 1	
NGF	神経成長因子	bFGF	塩基性線維芽細胞成長因子
EGF	上皮細胞成長因子	TNF	腫瘍壊死因子
PDGF	血小板由来増殖因子	INF $\alpha$	インターフェロナルファ
TGF $\alpha$	腫瘍増殖因子アルファ	IL-1	インターロイキン-1
TGF $\beta$	腫瘍増殖因子ベータ	IL-6	インターロイキン-6
IGF-I	インシュリン様成長因子		

## 【0041】

【発明の効果】本発明のラット脳ミクログリアセルラインは、無限増殖性を有するため、試験管内で大量に培養することができ、NTFを多量に取得するのに極めて適している。さらにこのラット脳ミクログリアセルラインは、ラット由来であるため、既存のマウス由来ミクログリアセルラインとは異なった、新規のNTFを提供することができる。

【0042】本発明のラット脳ミクログリアセルラインはミクログリアの生理機能を有しているため、ミクログ

リアの基礎的機能の研究およびその機能を調節する物質の探索などに幅広く利用することができる。

【0043】また、本発明のラット脳ミクログリアセルラインは、SV40温度感受性変異株由来の無限増殖化遺伝子を導入しており、培養液の温度を調節することにより増殖性が調節できるため、NTFの産生に適している。

【0044】さらに温度変化により、あるいはリボポリサッカライド、IFN- $\gamma$ などの刺激剤やレチノイン酸などの分化誘導剤などの各種薬剤によって処理すること



により、NTFの産生増大が期待され、また細胞分化の研究資料として用いることもできる。

【0045】本発明の培養上清および／または細胞ホモジネートは、神経細胞の生存、成長を直接促進し、神経細胞の機能を賦活する作用を有するため、神経細胞の機能が虚血により低下している脳血管障害やそれによる後遺症、神経細胞の老化により発症すると考えられているアルツハイマー型老年痴呆など、神経細胞の機能障害を伴う脳疾患の治療に有効に用いることができる。

【0046】NTFの持つ、神経細胞の成長、生存の促進作用は、上記脳疾患の直接的な原因である神経細胞の機能低下そのものを回復させるため、いままでこのような疾患に用いられてきた脳代謝賦活剤や脳循環改善剤などのような対症療法剤と異なり、本質的な治療剤として医療に貢献することができる。

【0047】本発明は、ラットの脳から得られるNTF

を含む培養上清および／または細胞ホモジネートに関するものであるが、同様の物質がヒトの脳にも存在することが容易に想定されるため、そのような物質を遺伝子工学などの手法により取得、同定する研究においても、本発明は有用である。

【0048】本発明の培養上清および／または細胞ホモジネートは非常に重要な生理活性を有するため、必要に応じて医学、理学上の基礎的な研究に使用するための試薬としても有効に利用することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】抗ラージT抗原抗体を用いて、当該セルラインホモジネートをウエスタンブロット法により染色した結果を示す図である。

【図2】ミクログリア不死化プラスミドの作製手順を示す図である。

【図1】

分子重(キログルトン)      A      B      C

180 —

116 —

84 —

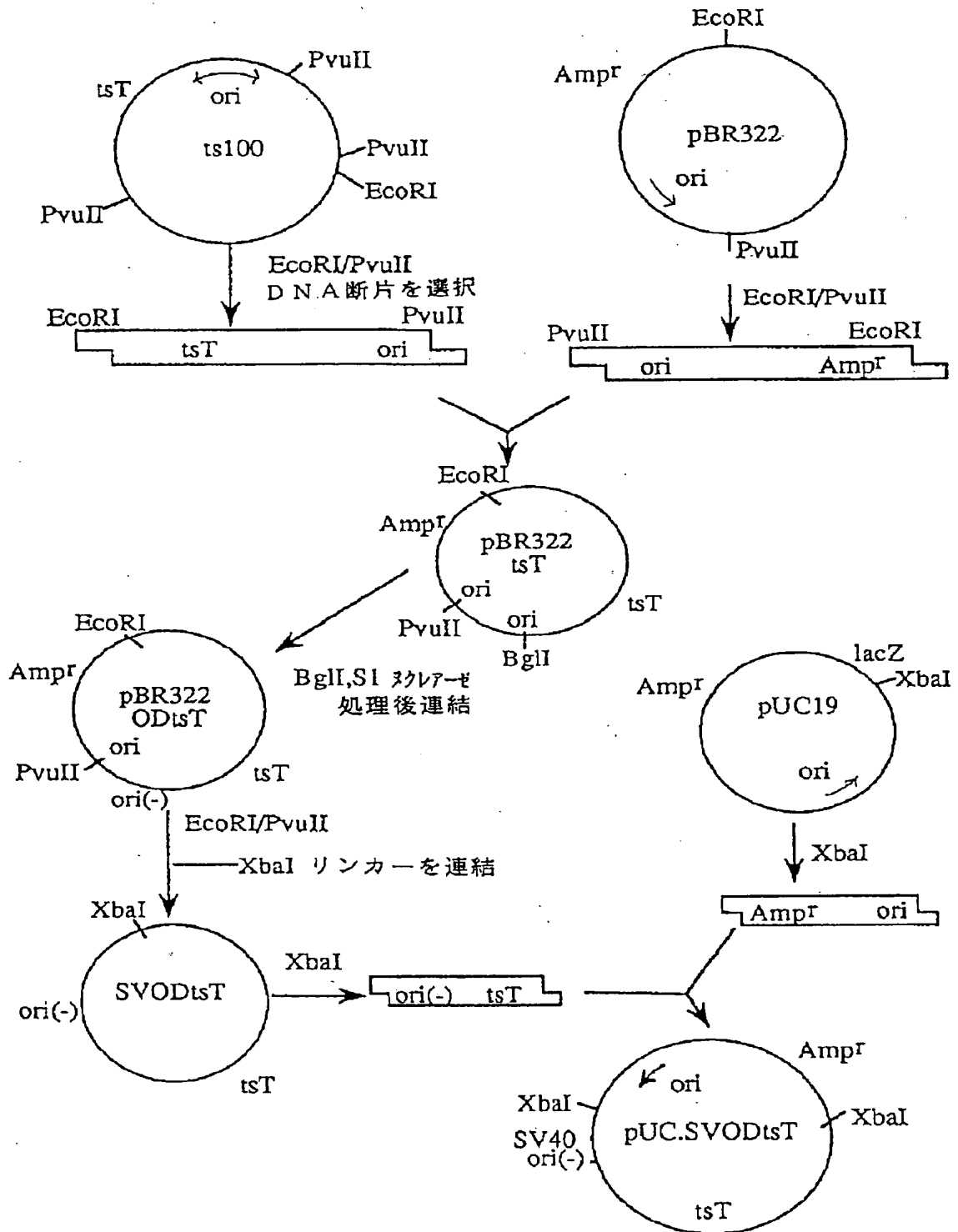
58 —

A: COS-7 (ポジティブコントロール)

B: 初代培養ミクログリア

C: RBMJ29

【図 2】



## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C12N 5/10

C12R 1:91 )

(C12N 15/09

C12R 1:91 )

(C12P 21/02

C12R 1:91 )

7236-4B

C12N 5/00

B

8828-4B

15/00

A